

明 細 書

新規微生物及びその微生物を用いた有機性固形物の処理方法

5 技術分野

本発明は、下水処理場、屎尿処理場などの下水処理プロセスから排出される生汚泥及び余剰汚泥等の生物性汚泥、或いは食品工場、化学工場などの製造プロセスまたは排水処理プロセスから排出される有機性汚泥等の各種の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有する新規微生物と、その微生物を用いた有機性固形物の処理方法に関する。

背景技術

従来より、下水処理場や屎尿処理場などの下水処理プロセスから排出される生汚泥及び余剰汚泥等の生物性汚泥や、食品工場、化学工場などの製造プロセスまたは排水処理プロセスから排出される有機性汚泥等の各種の有機性固形物を処理する方法として、細菌等を有機性固形物に作用させて生物学的に分解する、下記先行技術文献 1 乃至 4 に示すような有機性固形物の可溶化のための方法並びにその方法への応用が期待される菌株がこれまでに報告されている。

先行技術文献 1 : 特開平 7 - 184640 号公報

20 先行技術文献 2 : バイオテクノロジーを活用した新排水処理システムの開発報告書 (下水道編)、pp73-77、(財) 土木研究センター (平成 3 年 2 月)

先行技術文献 3 : SHIGERU KUME and YUSAKU FUJIO, "DIGESTION OF MUNICIPAL SEWAGE SLUDGE BY A MIXREOF

25 THERMOPHILIC BACILLI AND THEIR CULTURE EXTRACT", J.Gen.Appl. Microbiol., 36 189-194 (1990)

先行技術文献 4 : YUSAKU FUJIO and SHIGERU KUME, "Isolation and
Idetification of Thermophilic Bacteria from Sewage Sludge
Compost ", JOURNAL OF FERMENTASION AND
BIOENGINEERING , Vol.72, No.5,334-337,(1991)

5 上記先行技術文献 1 は、酵母エキ스残渣を特異的に分解する酵素を生産する菌株、
オエルスコフィア属に属する細菌 (Oerskovia sp.24(FERM P-13692)) を用いた酵母
エキス残渣を処理方法である。

また、上記先行技術文献 2 は、滅菌済余剰汚泥を嫌氣的条件下で特異的に可溶化
する、クロストリジウム・ピフェルメンタンス (Clostridium bifermentans) に属する
10 嫌氣性の菌株について開示するものである。

さらに、上記先行技術文献 3 及び 4 は、下水汚泥コンポストから好氣的にかつ高
温条件下で単離したバチルス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus
)に属する菌株を用いた汚泥の消化について開示するものある。

しかしながら、上記先行技術文献 1 記載の方法によれば、分解処理できる対象が
15 実質的に酵母エキス残渣に限定されてしまうという問題がある。

また、上記先行技術文献 2 乃至先行技術文献 4 に開示された菌株では、汚泥の可
溶化効率が、それぞれ、10 日間で 25%、20 日間で 40~50%程度であり、所定の可
溶化率を得るには多大な時間を要しており、処理効率が低いものとなっていた。そ
して、この処理効率の低さが当該菌株の工業的利用に向けての課題として依然とし
20 て残っている。

発明の開示

本発明者等は、このような問題点を解決するために、汚泥等の有機性固形物の優
れた可溶化効果を有し、且つ所定の可溶化率を得るための処理時間を著しく短縮す
ることができ、処理効率を高めることができる微生物を探索した。
25

その結果、このような条件を満たすジオバチルス属の新規微生物を単離し、本発

明を完成するに至った。

すなわち、請求項1記載の発明は、ジオバチルス (Geobacillus) 属に属し、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有することを特徴とする新規微生物である。

- 5 また、請求項2記載の発明は、ジオバチルス (Geobacillus) 属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、下記菌学的性質を有することを特徴とする新規微生物である。

A. 形態的性質

- 10 (1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ~0.8 μm 、長さ 2.0 ~4.0 μm の桿菌
 (2) 運動性の有無：有り
 (3) 胞子の有無：有り

B. 培養的性質（普通寒天 [Nutrient agar] 平板培養）

- 15 (1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状
 (2) 色：クリーム色
 (3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

- 20 (1) グラム染色性：+
 (2) 硝酸塩の還元：-
 (3) インドールの生成：-
 (4) 硫化水素の生成：-
 (5) クエン酸の利用：-
 (6) ウレアーゼ：-
 (7) オキシダーゼ：+
 (8) カタラーゼ：+
25 (9) 酸素に対する態度：好気性
 (10) O-Fテスト（グルコース）：-/-

(11) 糖類からの酸及びガスの生成

D-グルコース：酸（+）／ガス（-）

さらに、請求項3記載の発明は、ジオバチルス（Geobacillus）属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の

5 生産能を有し、下記菌学的性質を有することを特徴とする新規微生物である。

A. 形態的性質

(1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ~0.8 μm 、長さ 2.0 ~4.0 μm の桿菌

(2) 運動性の有無：有り

(3) 胞子の有無：有り

10 B. 培養的性質（普通寒天〔Nutrient agar〕平板培養）

(1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状

(2) 色：クリーム色

(3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

15 (1) グラム染色性：+

(2) 硝酸塩の還元：-

(3) インドールの生成：-

(4) 硫化水素の生成：-

(5) クエン酸の利用：-

20 (6) ウレアーゼ：-

(7) オキシダーゼ：+

(8) カタラーゼ：+

(9) 酸素に対する態度：好気性

(10) O-Fテスト（グルコース）：-/-

25 (11) 糖類からの酸及びガスの生成

D-グルコース：酸（+）／ガス（-）

(12) 醗酵性試験

- (a) D-グルコース：＋
- (b) D-フラクトース：＋
- (c) D-マンノース：＋
- 5 (d) D-ソルビトール：－
- (e) イノシトール：－
- (f) マルトース：＋
- (g) トレハロース：＋

(13) その他の生理学的性質

- 10 (a) β -ガラクトシダーゼ活性：－
- (b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－
- (c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－
- (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－
- (e) アセトイン産生：－
- 15 (f) ゼラチナーゼ活性：＋
- (g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

また、請求項4記載の発明は、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4 (FERM BP-08452) である請求項1記載の新規微生物であり、請求項5記載の発明は、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 5 (FERM BP-08453) である請求項1記載の新規微生物であり、請求項6記載の発明は、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6 (FERM BP-08454) である請求項1記載の新規微生物であり、請求項7記載の発明は、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 7 (FERM BP-08455) である請求項1記載の新規微生物である。

さらに、請求項8記載の発明は、ジオバチルス属に属する新規微生物であって、

- 25 有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、
16S rRNA遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号1に記載の配列であることを

特徴とする新規微生物である。

さらに、請求項 9 記載の発明は、ジオパチルス属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、16 S r R N A 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 2 に記載の配列であることを
5 特徴とする新規微生物である。

さらに、請求項 10 記載の発明は、ジオパチルス属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、16 S r R N A 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 4 に記載の配列であることを特徴とする新規微生物である。

10 さらに、請求項 11 記載の発明は、請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の新規微生物を用いて有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化することを特徴とする有機性固形物の処理方法である。

さらに、請求項 12 記載の発明は、請求項 4 記載の新規微生物、請求項 5 記載の新規微生物、又は請求項 6 記載の新規微生物のいずれかと、請求項 7 記載の新規微生物とを混合した混合微生物によって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化することを特徴とする有機性固形物の処理方法である。
15

本発明によれば、上述のように、生物性汚泥或いは有機性汚泥等の有機性固形物を可溶化する性質を有するジオパチルス属の新規微生物であるジオパチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4、ジオパチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T
20 5、ジオパチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6、ジオパチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 7 を提供するに至った。

特に、本発明では、1 日程度の極めて短い期間に優れた汚泥可溶化効果を奏するので、実装置に用いる場合に、装置運転の立ち上げ時間が早いという効果がある。

さらに、本発明では 50℃～65℃程度とさほど高くない温度で優れた可溶化効果を奏するので、実装置に用いる場合のエネルギー面での経済性も飛躍的に向上するという効果がある。
25

そして、この新規微生物を用いて有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する処理方法によって、下水処理場、屎尿処理場などの下水処理プロセスから排出される生汚泥及び余剰汚泥等の生物性汚泥、或いは食品工場、化学工場などの製造プロセスまたは排水処理プロセスから排出される有機性汚泥等の各種の有機性固形物を、効率良く可溶化することができる。

特に、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 5、又はジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6 のいずれかと、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 7 とを混合した混合微生物を用いる場合には、汚泥の可溶化率がより向上するという効果がある。

図面の簡単な説明

図 1 は、一実施形態としての微生物を利用した有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 2 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 3 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 4 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 5 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 6 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 7 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 8 は、図 7 の処理装置で行う回分式処理工程のブロック図。

図 9 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 10 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

図 11 は、他実施形態の有機性廃水の処理装置を示す概略ブロック図である。

25 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施形態について説明する。

〔菌株のスクリーニング〕

本発明の後述する各実施形態の微生物の単離は、次のようにして行った。

すなわち、下水処理場における余剰汚泥より、菌株分離用に汚泥を採取した。採取した汚泥を、 $1 \times 10^{-2} \sim 10^{-5}$ 倍に滅菌水で希釈した後、普通寒天〔Nutrient agar〕

- 5 培地の寒天プレート（Oxoid 社製）に塗布した。このプレートを、60℃で一晩培養し、単コロニーを得た。

得られた単コロニーに関して、スキムミルクの分解能、滅菌汚泥の分解能を、基質混合培地でのハコ形成の有無で確認し、ハコを形成した株でも、特に汚泥分解能が大きいもの4菌株を特徴株として選抜した。具体的には、これらを0.1重量／容量%混合した寒天培地においてハコ（溶解班）を形成する程度に応じて目視により判定した。

スキムミルクの分解能の検定は、R.BEAUDET, C.GAGNON, J.G BISAILLON and M.ISHAQUE, "Microbiological Aspects of Aerobic Thermophilic Treatment of Swine Waste", Applied and Environmental Microbiology, 971 ~976 頁、（1990年4月）の変法によった。

（実施形態1）

上記のようにして選抜した4菌株のうち、1つの菌株の菌学的性質について試験した。その菌学的性質（形態的性質、培養的性質、生理学的性質）は次のとおりである。

20 A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ~0.8 μm 、長さ 2.0 ~4.0 μm の桿菌
- (2) 運動性の有無：有り
- (3) 胞子の有無：有り

B. 培養的性質（普通寒天〔Nutrient agar〕平板培養）

- 25 (1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状
- (2) 色：クリーム色

(3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

(1) グラム染色性：＋

(2) 硝酸塩の還元：－

5 (3) VPテスト：－

(4) インドールの生成：－

(5) 硫化水素の生成：－

(6) デンプンの加水分解：－

(7) クエン酸の利用：－

10 (8) ウレアーゼ：－

(9) オキシダーゼ：＋

(10) カタラーゼ：＋

(11) 生育の範囲

(a) pH：6.0 ～8.0

15 (b) 温度：45℃～65℃

(12) 酸素に対する態度：好気性

(13) O－Fテスト (Hugh Leifson 法)：－／－

(14) 糖類からの酸及びガスの生成

D－グルコース：酸（＋）／ガス（－）

20 (15) 醗酵性試験

(a) グリセロール：－

(b) L－アラビノース：－

(c) D－キシロース：－

(d) D－ガラクトース：－

25 (e) D－グルコース：＋

(f) D－フラクトース：＋

- (g) D-マンノース：＋
- (h) D-マンニトール：＋
- (i) イノシトール：－
- (j) ソルビトール：－
- 5 (k) マルトース：＋
- (l) ラクトース：＋
- (m) スクロース：－
- (n) トレハロース：＋

(16) その他の生理学的性質

- 10 (a) β -ガラクトシダーゼ活性：－
- (b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－
- (c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－
- (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－
- (e) アセトイン産生：－
- 15 (f) ゼラチナーゼ活性：＋
- (g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

さらに、上記生理学的性質における菌株が生育する pH 及び温度の測定は次のようにして行った。

- すなわち、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうちの一方で、測定対象の pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、60℃で 15 時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表 1 に示す。
- 20

表 1

p H	生育度
6. 0	+
6. 5	+
7. 0	+
7. 5	+
8. 0	±

+ : 陽性
 ± : 弱陽性

上記表 1 から明らかなように、本実施形態の菌株は、p H6.0 ~8.0 の範囲において生育することが判明した。

次に、0.1 N塩酸（和光純薬社製）及び0.1 N水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうちの一方で、p H6.5 に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（
 5 Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、測定対象の温度（37℃、45℃、50℃、60℃、65℃）で15時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表 2 に示す。

表 2

温度	生育度
37℃	—
45℃	±
50℃	+
60℃	+
65℃	+

+ : 陽性
 ± : 弱陽性
 — : 陰性

上記表 2 から明らかなように、本実施形態の菌株は、50℃～65℃の範囲において生育することが判明した。

また、この菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。その配列は、配列表の配列番号 1 に記載のとおりである。この解析に際しては、先ず本実施形態の菌株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅した。60℃で 6 時間振とう培養した本実施形態の菌株より、Heng Zhu 等の方法 (Heng Zhu, Feng Qu and Li-Husang Zhu, "Isolation of genomic DNAs from 1993") に従い精製した DNA を鋳型として PCR を行った。プライマーは、「微生物の分類・同定実験法 分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に」(鈴木健一郎・平石明・横田明編、シュウプリンガー・フェアラーク東京) に記載の 2 種類の合成オリゴヌクレオチド (27f,1492r) を用いた。これらのプライマーの塩基配列は、配列表の配列番号 5, 6 に記載のとおりである。

PCR 反応は、以下のとおりである。すなわち、1×PCR Buffer(東洋紡績株式会社), 0.2mM dNTPs(東洋紡績株式会社), 1mM MgSO₄(東洋紡績株式会社), 本実施形態の菌株 DNA 100mg、それぞれ 0.5 μM のプライマー、及び KOD-Plus (東洋紡績株式会社) よりなる反応液を、94℃、2 分処理した後、94℃、30 秒の熱変性、55℃、30 秒のアニーリング、68℃、1 分 30 秒の伸長反応を 30 サイクル行った。最後に 68℃、7 分の伸長反応を行った後、PCR 産物を得た。この PCR 産物を QIA quick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用いて精製した後、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。遺伝子の塩基配列の決定は、DNA 解読装置 (DNA シーケンサー) を用いた。

本実施形態の菌株の塩基配列について、遺伝子データベースである National Center for Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上で BLAST ホモロジー検索を行った結果、データベース上に登録された公知のジオバチルス (*Geobacillus*) 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に近似していることがわかった。

以上のような菌学的性質の試験結果や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、本実

施形態の菌株は、ジオバチルス属に属する新規な微生物であると認められ、ジオバチルス・エスピー (*Geobacillus* sp.) S P T 4 と命名し、2003 年 8 月 18 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した (FERM BP-08452)。

- 5 上記菌株ジオバチルス・エスピー (*Geobacillus* sp.) S P T 4 は、後述の実施例に示すように、優れた汚泥可溶化能を有する汚泥可溶化酵素を産生する性質を有するものである。従って、この菌株は、後述するような種々の汚泥の生物学的処理方法に用いることができる。すなわち、下水処理場、屎尿処理場などの下水処理プロセスから排出される生汚泥及び余剰汚泥等の生物性汚泥、或いは食品工場、化学工場
10 などの製造プロセスまたは排水処理プロセスから排出される有機性汚泥等の各種の汚泥に上記菌株を添加することによって、これらの汚泥を好適に可溶化することができる。

- 上記菌体の添加量は、処理対象の汚泥の有機性固形物含有量及び他の特性に応じて適宜選択されるべきであり、特に限定されないが、例えば、普通液体培地 (Oxoid
15 o 社製)において約 15 時間培養しておいた菌培養液であれば、汚泥に対して 0.5 ~ 3 容量%程度添加することが好ましい。

(実施形態 2)

- 上記のようにして選抜した 4 菌株のうち、他の 1 つの菌株の菌学的性質について試験した。その菌学的性質 (形態的性質、培養的性質、生理学的性質) は次のとおりである。
20

A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ : 幅 0.8 μm 、長さ 2.0 ~ 4.0 μm の桿菌

伸長あり

- (2) 運動性の有無 : 有り

- 25 (3) 孢子の有無 : 有り

B. 培養的性質 (普通寒天 [Nutrient agar] 平板培養)

(1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状

(2) 色：クリーム色

(3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

5 (1) グラム染色性：＋

(2) 硝酸塩の還元：－

(3) VPテスト：－

(4) インドールの生成：－

(5) 硫化水素の生成：－

10 (6) デンプンの加水分解：－

(7) クエン酸の利用：－

(8) ウレアーゼ：－

(9) オキシダーゼ：＋

(10)カタラーゼ：＋

15 (11) 生育の範囲

(a) pH：6.0 ～8.0

(b) 温度：50℃～65℃

(12) 酸素に対する態度：好気性

(13) O-Fテスト (Hugh Leifson 法)：－／－

20 (14) 糖類からの酸及びガスの生成

D-グルコース：酸(＋)／ガス(－)

(15) 醗酵性試験

(a) グリセロール：＋

(b) L-アラビノース：＋

25 (c) D-キシロース：＋

(d) D-ガラクトース：＋

- (e) D-グルコース：＋
- (f) D-フラクトース：＋
- (g) D-マンノース：＋
- (h) D-マンニトール：＋
- 5 (i) イノシトール：－
- (j) ソルビトール：－
- (k) マルトース：＋
- (l) ラクトース：－
- (m) スクロース：＋
- 10 (n) トレハロース：＋
- (16) その他の生理学的性質
- (a) β -ガラクトシダーゼ活性：－
- (b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－
- (c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－
- 15 (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－
- (e) アセトイン産生：－
- (f) ゼラチナーゼ活性：＋
- (g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

さらに、上記生理学的性質における菌株が生育する pH 及び温度の測定は次のよ

- 20 うにして行った。

すなわち、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうち的一方で、測定対象の pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、60℃で 15 時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度

- 25 を定性的に測定した。その結果を下記表 3 に示す。

表 3

p H	生育度
6. 0	+
6. 5	+
7. 0	+
7. 5	+
8. 0	±

+ : 陽性
 ± : 弱陽性

上記表 3 から明らかなように、本実施形態の菌株は、p H6.0 ~8.0 の範囲において生育することが判明した。

次に、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社製）
 5 、又はこれらのうちの一方で、p H6.5 に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、測定対象の温度（37℃、45℃、50℃、60℃、65℃）で 15 時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表 4 に示す。

表 4

温度	生育度
3 7℃	—
4 5℃	—
5 0℃	+
6 0℃	+
6 5℃	+

+ : 陽性
 — : 陰性

上記表 4 から明らかなように、本実施形態の菌株は、50℃～65℃の範囲において生育することが判明した。

また、この菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。その配列は、配列表の配列番号 2 に記載のとおりである。この解析に際しては、本実施形態
5 の菌株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅した。PCR 法は実施形態 1 と同様の操作で行った。また温度条件や反応サイクルも実施形態 1 と同様とした。

プライマーも実施形態 1 と同じものを用いた。遺伝子の塩基配列の決定も実施形態 1 と同様の DNA 解読装置（DNA シーケンサー）を用いた。

本実施形態の菌株の塩基配列について、実施形態 1 と同様の遺伝子データベース
10 上で BLAST ホモロジー検索を行った結果、データベース上に登録された公知のジオバチルス（Geobacillus）属細菌の 16S rRNA 遺伝子に近似していることがわかった。

以上のような菌学的性質の試験結果や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、本実施形態の菌株は、ジオバチルス属に属する新規な微生物であると認められ、ジオバ
15 チルス・エスピー（Geobacillus sp.）SPT 5 と命名し、2003 年 8 月 18 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した（FERM BP-08453）。

上記菌株ジオバチルス・エスピー（Geobacillus sp.）SPT 5 も、ジオバチルス・エスピー（Geobacillus sp.）SPT 4 と同様に優れた汚泥可溶化能を有する汚泥可溶
20 化酵素を産生する性質を有するものであり、後述するような種々の汚泥の生物学的処理方法に用いることができる。

（実施形態 3）

上記のようにして選抜した 4 菌株のうち、さらに他の 1 つの菌株の 1 つの菌株の菌学的性質について試験した。その菌学的性質（形態的性質、培養的性質、生理学的性質）は次のとおりである。

A. 形態的性質

(1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ~0.8 μm 、長さ 2.0 μm の桿菌

(2) 運動性の有無：有り

(3) 胞子の有無：有り

B. 培養的性質（普通寒天 [Nutrient agar] 平板培養）

5 (1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状

(2) 色：クリーム色

(3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

(1) グラム染色性：+

10 (2) 硝酸塩の還元：-

(3) VPテスト：-

(4) インドールの生成：-

(5) 硫化水素の生成：-

(6) デンプンの加水分解：-

15 (7) クエン酸の利用：-

(8) ウレアーゼ：-

(9) オキシダーゼ：+

(10) カタラーゼ：+

(11) 生育の範囲

20 (a) pH：6.0 ~8.0

(b) 温度：50℃~65℃

(12) 酸素に対する態度：好気性

(13) O-Fテスト (Hugh Leifson 法)：-/-

(14) 糖類からの酸及びガスの生成

25 D-グルコース：酸 (+) / ガス (-)

(15) 醗酵性試験

- (a) グリセロール：－
- (b) L－アラビノース：－
- (c) D－キシロース：－
- (d) D－ガラクトース：－
- 5 (e) D－グルコース：＋
- (f) D－フラクトース：＋
- (g) D－マンノース：＋
- (h) D－マンニトール：－
- (i) イノシトール：－
- 10 (j) ソルビトール：－
- (k) マルトース：＋
- (l) ラクトース：－
- (m) スクロース：－
- (n) トレハロース：＋
- 15 (16) その他の生理学的性質
- (a) β －ガラクトシダーゼ活性：－
- (b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－
- (c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－
- (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－
- 20 (e) アセトイン産生：－
- (f) ゼラチナーゼ活性：＋
- (g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

さらに、上記生理学的性質における菌株が生育する pH 及び温度の測定は次のようにして行った。

-
- 25 すなわち、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうち的一方で、測定対象の pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）に調

整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、60℃で15時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表5に示す。

5

表 5

p H	生育度
6. 0	+
6. 5	+
7. 0	+
7. 5	+
8. 0	±

＋：陽性
±：弱陽性

上記表5からも明らかなように、本実施形態の菌株は、p H6.0 ～8.0 の範囲において生育することが判明した。

10 次に、0.1 N塩酸（和光純薬社製）及び0.1 N水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうちの一方で、p H6.5 に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoido 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、測定対象の温度（37℃、45℃、50℃、60℃、65℃）で15時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表6に示す。

15

20

25

表 6

温度	生育度
37℃	—
45℃	—
50℃	+
60℃	+
65℃	+

+ : 陽性

— : 陰性

- 5 上記表 6 から明らかなように、本実施形態の菌株は、50℃～65℃の範囲において生育することが判明した。

また、この菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。その配列は、配列表の配列番号 3 に記載のとおりである。この解析に際しては、先ず本実施形態の菌株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅した。PCR 法は実施形態 1 と同様の操作で行った。また温度条件や反応サイクルも実施形態 1 と同様とした。さらに、プライマーも実施形態 1 と同様のものを用いた。

遺伝子の塩基配列の決定も実施形態 1 と同様の DNA 解読装置（DNA シーケンサー）を用いた。

本実施形態の菌株の塩基配列について、実施形態 1 と同様の遺伝子データベース上で BLAST ホモロジー 検索を行った結果、データベース上に登録された公知のジオバチルス (*Geobacillus*) 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に近似していることがわかった。

以上のような菌学的性質の試験結果や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、本実施形態の菌株は、ジオバチルス属に属する新規な微生物であると認められ、ジオバ

チルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6 と命名し、2003 年 8 月 18 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した (FERM BP-08454)。

上記菌株ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6 も、ジオバチルス・

- 5 エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4 と同様に優れた汚泥可溶化能を有する汚泥可溶化酵素を産生する性質を有するものであり、汚泥の生物学的処理方法に用いることができる。

(実施形態 4)

- 10 上記のようにして選抜した 4 菌株のうち、さらに他の 1 つの菌株の 1 つの菌株の菌学的性質について試験した。その菌学的性質 (形態的性質、培養的性質、生理学的性質) は次のとおりである。

A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ : 幅 $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 、長さ $2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$ の桿菌
(2) 運動性の有無 : 有り
15 (3) 胞子の有無 : 有り

B. 培養的性質 (普通寒天 [Nutrient agar] 平板培養)

- (1) コロニーの形態 : 円形、全縁滑らか、低凸状
(2) 色 : クリーム色
(3) 光沢 : 有り

20 C. 生理学的性質

- (1) グラム染色性 : +
(2) 硝酸塩 (硫酸塩) の還元 : -
(3) VP テスト : -
(4) インドールの生成 : -
25 (5) 硫化水素の生成 : -
(6) デンプンの加水分解 : +

- (7) クエン酸の利用：－
- (8) ウレアーゼ：－
- (9) オキシダーゼ：＋
- (10) カタラーゼ：＋
- 5 (11) 生育の範囲
 - (a) pH：6.0 ～8.0
 - (b) 温度：45℃～65℃
- (12) 酸素に対する態度：好気性
- (13) O－Fテスト（Hugh Leifson 法）：－／－
- 10 (14) 糖類からの酸及びガスの生成
 - D－グルコース：酸（＋）／ガス（－）
- (15) 醗酵性試験
 - (a) グリセロール：－
 - (b) L－アラビノース：＋
 - 15 (c) D－キシロース：＋
 - (d) D－ガラクトース：－
 - (e) D－グルコース：＋
 - (f) D－フラクトース：＋
 - (g) D－マンノース：＋
 - 20 (h) D－マンニトール：＋
 - (i) イノシトール：－
 - (j) ソルビトール：－
 - (k) マルトース：＋
 - (l) ラクトース：－
 - 25 (m) スクロース：－
 - (n) トレハロース：＋

(16) その他の生理学的性質

(a) β -ガラクトシダーゼ活性：－

(b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－

(c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－

5 (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－

(e) アセトイン産生：－

(f) ゼラチナーゼ活性：＋

(g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

さらに、上記生理学的性質における菌株が生育する pH 及び温度の測定は次のよ
 10 うにして行った。

すなわち、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社
 製）、又はこれらのうち的一方で、測定対象の pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）に調
 整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoid 社製）を調製し、この培地に本実施形
 態の菌株を接種し、60℃で 15 時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度
 15 を定性的に測定した。その結果を下記表 7 に示す。

表 7

pH	生育度
6.0	±
6.5	＋
7.0	＋
7.5	＋
8.0	＋

＋：陽性
 ±：弱陽性

上記表 7 から明らかなように、本実施形態の菌株は、pH6.0 ～8.0 の範囲において生育することが判明した。

次に、0.1 N 塩酸（和光純薬社製）及び 0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬社製）、又はこれらのうち的一方で、pH6.5 に調整した普通寒天〔Nutrient agar〕培地（Oxoid 社製）を調製し、この培地に本実施形態の菌株を接種し、測定対象の温度（37℃、45℃、50℃、60℃、65℃）で 15 時間培養した菌株の増殖菌体量を観察し、その生育度を定性的に測定した。その結果を下記表 8 に示す。

表 8

温度	生育度
37℃	—
45℃	±
50℃	+
60℃	+
65℃	+

+：陽性
 ±：弱陽性
 —：陰性

上記表 8 から明らかなように、本実施形態の菌株は、45℃～65℃の範囲において生育することが判明した。

また、この菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。その配列は、配列表の配列番号 4 に記載のとおりである。この解析に際しては、本実施形態の菌株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅した。PCR 法は実施形態 1 と同様の操作で行った。また温度条件や反応サイクルも実施形態 1 と同様とした。

さらに、プライマーも実施形態 1 と同様のものを用いた。遺伝子の塩基配列の決定も実施形態 1 と同様の DNA 解読装置（DNA シーケンサー）を用いた。

本実施形態の菌株の塩基配列について、実施形態 1 と同様の遺伝子データベース

上でBLASTホモロジー検索を行った結果、データベース上に登録された公知のジオバチルス (Geobacillus) 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に近似していることがわかった。

5 以上のような菌学的性質の試験結果や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、本実施形態の菌株は、ジオバチルス属に属する新規な微生物であると認められ、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) SPT 7 と命名し、2003 年 8 月 18 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した (FERM BP-08455)。

10 上記菌株ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) SPT 7 も、ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) SPT 4 と同様に優れた汚泥可溶化能を有する汚泥可溶化酵素を産生する性質を有するものであり、汚泥の生物学的処理方法に用いることができる。

【実施例】

以下、本発明の実施例について説明する。

15 (実施例 1)

上記各実施形態の菌株を用いて、汚泥の可溶化試験を行った。

汚泥の可溶化試験は、神戸市内の下水処理場から採取した余剰汚泥を用いて実施した。可溶化試験に用いた滅菌洗浄汚泥の調整方法と可溶化試験方法を次に説明する。

20 [滅菌汚泥調整方法]

1. 余剰汚泥を 121℃、15 分オートクレーブ処理した後、遠心操作 (約 15000g, 10 分) により沈殿物を回収する。
2. その沈殿物を純水に十分に懸濁した後に、上記条件でオートクレーブ処理し、遠心操作により沈殿物を回収した。
- 25 3. 沈殿物を純水に再懸濁後、遠心操作により洗浄した。この操作は 2 回繰り返した。

4. 沈殿物を約 10000mg/l となるように純水に懸濁した後、オートクレーブ処理したものを実験に供試した。

〔可溶化試験方法〕

1. 63℃でLB液体培地（DIFCO 社製：バクトトリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g、塩化ナトリウム 5g、蒸留水 1L）で一晩培養した各菌株を容積比で 1% になるように、上記滅菌洗浄汚泥に添加し、63℃で振とう培養した。その VSS(Volatile Suspended Solids)濃度を下水道試験方法（上巻）〔1997 年版、p 296～297、財団法人日本下水道協会〕に基づいて測定した。

2. 汚泥の VSS 可溶化率は、次の式に基づいて求めた。

10
$$\text{VSS 可溶化率} = [(\text{初発 VSS 濃度} - \text{培養後 VSS 濃度}) / \text{初発 VSS 濃度}] \times 100(\%)$$

試験結果を表 9 に示す。尚、表 9 において、対照とは、系に菌を添加しない場合を意味する。

表 9

培養時間（時間）	STP 4	STP 5	STP 6	STP 7	対照
0	0	0	0	0	0
24	25.7	26.3	26.1	23.5	3.6
48	35.5	35.0	36.7	33.2	4.5

表 9 から明らかなように、実施形態 1 乃至 4 のいずれの菌株も、培養した後、24 時間経過後に 25% 前後の優れた汚泥の可溶化率を示し、48 時間経過後には 35% 前後の優れた汚泥の可溶化率を示した。

20 尚、本実施例の汚泥の可溶化試験では、上記のように 63℃で可溶化を行なっているが、可溶化の温度はこれに限定されるものではない。上記実施形態 1 乃至 4 の菌株の生育温度に合わせて 45～70℃の温度範囲で可溶化を行なうことができる。ただし、優れた可溶化率を得るためには、50～65℃の温度範囲に設定するのが

好ましい。

次に、実施形態 1 乃至 3 の菌株を実施形態 4 の菌株と混合したものを用い、単独細菌を使用したときとの汚泥可溶化率の比較試験を行った。その結果を表 10 に示す。

5

表 10

培養時間 (時間)	STP4	STP5	STP6	STP7	STP4+STP7	STP5+STP7	STP6+STP7
0	0	0	0	0	0	0	0
2 4	25.3	26.8	24.4	22.7	26.6	27.7	25.5
4 8	36.0	35.4	37.1	33.8	38.0	42.5	39.3

表 10 から明らかなように、実施形態 1 乃至 3 の菌株と、実施形態 4 の菌株との
 10 混合細菌を使用した場合には、単独細菌を使用した場合に比べて汚泥可溶化率が上
 昇した。これは、実施形態 4 の S P T 7 株が高い pH 条件下で生育することを反映
 しているものと思われる。すなわち、先ず汚泥中のタンパク質が S P T 7 株以外の
 好熱性細菌の産生する酵素（プロテアーゼ、リパーゼ等）により分解され、アンモ
 ニアが産生されると汚泥の pH が上昇する。この条件で S P T 7 が活発に増殖し、
 15 汚泥可溶化に関与する酵素を産生することにより、汚泥の可溶化を促進するもの
 と思われる。

尚、実施形態 1 乃至 3 の菌株と、実施形態 4 の菌株とを混合して有機性固形物を
 可溶化する場合は、pH 7.0～8.5 の範囲で処理するのが好ましい。

（実施例 2）

20 上記各実施形態の菌株ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4、ジオ
 バチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 5、ジオバチルス・エスピー (Geobac
 illus sp.) S P T 6、及びジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 7 は、上

述のように優れた汚泥可溶化能を有する汚泥可溶化酵素を産生する性質を有するものであるので、各種汚泥の生物学的処理方法に用いることができる。

本実施例ではその生物処理方法の一例について説明する。

本実施例の生物処理方法を実施する装置は、図1に示すように、生物処理装置、
5 沈殿槽、及び可溶化槽を具備している。本実施例では、原廃水Aが経路1を経て生物処理槽2に導入され、生物処理槽2にて有機性廃水である原廃水が好氣的に生物処理される。好氣的生物処理とは、生物酸化によって有機物が二酸化炭素若しくは水等の無機物に分解されることをいう。

次に、生物処理された処理水Bは、経路3を経て固液分離装置としての沈殿槽4
10 に導入されて固液分離され、固液分離された上澄液Cは放流等され、固液分離された固形物である汚泥Dの一部は、経路5を経て経路1に合流して原廃水Aとともに生物処理槽2に導入される。

沈殿槽4で分離された残りの汚泥Eは、経路6を経て可溶化槽7へ導入される。
そして、可溶化槽7では、高温条件で好氣的に有機性固形物の可溶化が行われる。
15 この場合の可溶化処理に、上記実施形態1乃至4の各新規微生物が用いられる。

可溶化槽7は、上述のように生物処理槽2から供給される汚泥を可溶化させるためのものであり、この可溶化は、プロテアーゼ等の可溶化酵素によってなされるが、そのような可溶化酵素が上記実施形態1乃至4の菌株であるジオバチルス(*Geobacillus*)SPT4 [FERM P-08452]、ジオバチルス(*Geobacillus*)SPT5 [FERM P-08453]、ジオバチルス(*Geobacillus*)SPT6 [FERM P-08454]、ジオバチルス(*Geobacillus*)SPT7 [FERM P-08455]によって産生されるのである。このような菌株は、可溶化槽7に予め保持されるか、可溶化槽7に供給される汚泥に予め含有させてもよく、若しくは可溶化槽7に新たに添加されてもよい。また、このような4種の菌株は、単独若しくは混合して使用することが可能である。

25 可溶化槽7の温度は、上記実施形態1乃至4の菌株の生育温度に合わせて45～70℃の温度範囲、好ましくは50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。

また、pHは上記実施形態1乃至4の菌株の生育pHに合わせてpH5.5～9の範囲、好ましくは6～8.5の範囲になるように設定するのが好ましい。

(実施例3)

本実施例は、生物処理方法の他の例であり、本実施例の処理装置においては、図
5 2に示すように、沈殿槽4の後段側であって、可溶化槽7の前段側に濃縮装置9が
設けられている。可溶化槽7へ汚泥を供給する前に濃縮装置9で汚泥を濃縮するこ
とで、可溶化槽への汚泥投入量が減少し、結果的に可溶化槽7でもHRTが長くな
り、可溶化槽7から生物処理槽2に返送される処理液のBOD量を大幅に低減する
ことができる。濃縮装置9としては、膜濃縮、遠心濃縮、浮上濃縮、蒸発濃縮等の
10 手段を具備した濃縮装置を使用することができる。

可溶化槽7の温度は、上記実施例1と同様に45～70℃の温度範囲、好ましく
は50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pHも上記実施例2と
同様にpH5.5～9の範囲、好ましくは6～8.5の範囲になるように設定するのが好ま
しい。また、4種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例2と同様
15 である。さらに菌株を可溶化槽7に予め保持させ、又は可溶化槽7に供給される汚
泥に予め含有させ、或いは可溶化槽7に新たに添加しうることも実施例2と同様で
ある。

尚、この図2の処理装置では、固液分離された固形物である汚泥Dの一部が経路
5を経て経路1に合流して原廃水Aとともに生物処理槽2に導入され、沈殿槽4で
20 分離された残りの汚泥Eが濃縮装置9へ供給されるように構成されているが、これ
に限らず、図3に示すように沈殿槽4で分離した汚泥Dをすべて濃縮装置9で濃縮
した後、汚泥の一部を経路5を経て生物処理槽2に返送し、残りの汚泥を可溶化槽
7で好熱菌により可溶化することもできる。

(実施例4)

25 本実施例では、図4に示すように、生物処理槽2内に膜分離装置10を有し、生物
処理と並行して膜分離装置10による固液分離が行われる。従って、固液分離がより

好適に行われることとなる。

生物処理槽 2 内に配設される膜分離装置 10 には、たとえば孔径 $0.1 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 好ましくは $0.3 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の膜が使用される。

可溶化槽 7 の温度は、上記実施例 1 と同様に $45 \sim 70^\circ\text{C}$ の温度範囲、好ましくは $50 \sim 65^\circ\text{C}$ の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pH も上記実施例 2 と同様に pH $5.5 \sim 9$ の範囲、好ましくは $6 \sim 8.5$ の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4 種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例 2 と同様である。さらに菌株を可溶化槽 7 に予め保持させ、又は可溶化槽 7 に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽 7 に新たに添加しうることも実施例 2 と同様である。

(実施例 5)

本実施例は、微生物によりリン成分の除去を行う場合の実施例である。本実施例の処理装置は、図 5 に示すように、生物処理槽 2 が嫌気槽 2a と好気槽 2b とで構成されている。また、沈殿槽 4 の後段であって可溶化槽 7 の前段側に、リン放出装置 11 が設けられている。本実施例では、嫌気槽 2a において微生物からリンの放出が行われ、次に好気槽 2b において好氣的な微生物消化及び微生物によるリン成分の摂取（体内貯留）を行う。

次に、生物処理された処理液を沈殿槽 4 において、リン成分が濃縮された一次汚泥 x と一次処理水 a とに分離する。一次汚泥 x 中の微生物からリン成分を放出させるために、リン放出装置 11 においてリン成分を液相に放出させる。この場合のリン成分の放出は、たとえば嫌気処理、加熱処理、超音波処理、オゾン処理、アルカリ処理等によって行うことができるが、特に嫌気処理によって行うのが好ましい。次に、二次処理水 b に凝集剤を添加し、リン分離装置 12 において、リン成分を固形成分として凝集させて、リン成分を実質的に含まない三次処理水 c と固形リン成分 y を得る。この固形リン成分 y は、肥料やリン化合物製造のための原料として利用できるものである。上記二次汚泥 z は、さらに汚泥成分の減容化のために、可溶化槽

7で可溶化処理される。

可溶化槽7の温度は、上記実施例1と同様に45～70℃の温度範囲、好ましくは50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pHも上記実施例2と同様にpH5.5～9の範囲、好ましくは6～8.5の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例2と同様である。さらに菌株を可溶化槽7に予め保持させ、又は可溶化槽7に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽7に新たに添加しうることも実施例2と同様である。

(実施例6)

10 本実施例は、熱エネルギーの損失が少なく、処理系外に排出される処理水中の含窒有機分又は含窒無機分が少なく、大気中に放散される排ガスの除臭が可能である場合の実施例であり、図6に示すように、生物処理槽2に至る処理液経路には、硝化装置13と脱窒装置14が配置されており、沈殿槽4で分離された汚泥の一部は環流経路15を経て硝化装置13に返送されており、可溶化槽7で可溶化された処理液は、熱交換器16と返送経路17を経て脱窒装置14に返送される。また経路26を経て可溶化槽7に通入された空気は、経路27を経て硝化装置13に通入される。

有機性廃水中の NH_4^{++} 分は、硝化装置13において硝化菌により NO_2^- または NO_3^- に変えられ、この NO_2^- または NO_3^- は脱窒装置13に導入された後に大気中に放散されるので、大気中に放散されるガスの臭気は著しく弱められ、可溶化槽7から
20 排出されるガスの熱は硝化装置13において硝化处理に有効に利用されるので熱エネルギーの損失が少ない。

また、処理系外に排出される処理水中の含窒有機分又は含窒無機分は実質的にゼロである。

可溶化槽7の温度は、上記実施例1と同様に45～70℃の温度範囲、好ましくは50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pHも上記実施例2と同様にpH5.5～9の範囲、好ましくは6～8.5の範囲になるように設定するのが好ま

しい。また、4種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例2と同様である。さらに菌株を可溶化槽7に予め保持させ、又は可溶化槽7に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽7に新たに添加しうることも実施例2と同様である。

5 (実施例7)

本実施例の有機性廃水の処理装置は、図7に示すように、生物処理槽2と、可溶化槽7とで構成されている。生物処理槽2では回分式に有機性廃水の処理がなされる。原水である有機性廃水として、本実施形態では下水を用いた。

10 本実施例においては、原水の流入、反応、沈殿、排水、排泥等を1サイクルとして処理がなされる。より具体的には、図8に示すように、原水の流入受け入れ中に曝気、攪拌、曝気、攪拌、曝気、曝気停止による沈殿、固液分離、可溶化処理の工程が循環してなされることになる。この場合、
曝気は好氣的処理であり、攪拌は嫌氣的処理である。曝気と攪拌の繰り返し工程、
15 沈殿、固液分離の工程は生物処理槽2でなされ、可溶化処理の工程は可溶化槽7でなされる。

原水の流入受け入れから処理水の排出の一連の廃水処理の回分処理は、1日複数回（たとえば2～4回）行なうように各工程の処理時間を調整することが可能であるが、廃水の性状によっては1日に1回程度、或いは3日に2回程度の回分処理を行なうように各工程の処理時間が調整されていてもよい。

20 本実施例では、曝気の工程で硝化菌による硝化処理がなされ、曝気を停止した攪拌の工程で脱窒菌による脱窒処理がなされる。その後、曝気の停止によって、汚泥が沈降し、分離される。上澄みは放流等され、沈降した汚泥の一部は、次の回分処理のために生物処理槽2に保持され、汚泥の残りの一部は可溶化槽7へ供給されて可溶化処理される。可溶化槽7で可溶化処理された液は、図9に示すように、第一
25 段階の攪拌の工程へ返送されるのが好ましい。

可溶化処理液は、第一段階の曝気を停止する前の3時間から30分前、好ましくは

、1時間から30分前に生物処理槽2に返送される。サイクル数は、生物処理槽のBOD-SS負荷により決定される。一般に、高負荷運転（BOD-SS負荷：0.2～0.4kgBOD/kgSS・日）の場合は、曝気及び攪拌の硝化脱窒処理サイクルが3～4サイクルで運転されるのが好ましい。また、低負荷運転（BOD-SS負荷：0.03～0.05kgBOD/kgSS・日）の場合は、硝化脱窒処理サイクルが、2～3サイクルで運転するのが好ましい。

可溶化槽7の温度は、上記実施例1と同様に45～70℃の温度範囲、好ましくは50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pHも上記実施例2と同様にpH5.5～9の範囲、好ましくは6～8.5の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例2と同様である。さらに菌株を可溶化槽7に予め保持させ、又は可溶化槽7に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽7に新たに添加しうることも実施例2と同様である。

本実施例においては、曝気処理を停止する前の3時間～30分前、好ましくは1時間～30分前に可溶化処理汚泥が第一の（最初の）曝気処理工程における反応槽に返送される。これによって、可溶化処理汚泥に含まれる有機物を、脱窒処理の際のプロトン源（BOD源）として有効利用し、脱窒を促進させることができる。従って、プロトン源として一般に使用されるメタノール等の薬品量を低減できるので、その薬品量に伴うコストを低減できることとなる。

この場合の可溶化処理時間は12～72時間が好ましく、18～48時間がより好ましく、20～36時間が最も好ましい。

（実施例8）

本実施形態の有機性廃水の処理装置は、図9に示すように、嫌気槽18、一次曝気槽19、無酸素槽20、二次曝気槽21、沈殿槽4、及び可溶化槽7を具備している。

嫌気槽18は、有機性廃水を嫌氣的に消化するとともに、返送汚泥や、酸発酵液中の汚泥にリンが含有されている場合、汚泥中のリンを液中に放出する機能を有する

ものである。

一次曝気槽 19 は、前記嫌気槽 18 で嫌気処理された処理液を、曝気攪拌によって好氣的に生物処理し、嫌気処理された処理水中の有機物を酸化分解し、或いは流入アンモニアを硝化するためのものである。この一次曝気槽 5 は、要は曝気手段を具備するものであればよく、その曝気手段は問うものではないが、たとえば散気管等を用いることができる。曝気処理は、好氣性消化分解が許容されるよう、好ましくは、0.1～0.5 vvm の通気量で室温下にて実施されるが、負荷によっては、これを上回る通気量で、より高温で処理してもよい。被処理液は、好ましくは pH 5.0～8.0 に調整され、より好ましくは pH 7.0～8.0 に調整される。

10 無酸素槽 20 は、前記一次曝気槽 5 で好気処理された処理液を、脱窒処理するためのものである。

二次曝気槽 21 は、前記無酸素槽 6 で脱窒処理された処理液を、好氣的に生物処理するためのものである。この二次曝気槽 21 では、前記一次曝気槽 19 と同様に構成され、同様に曝気攪拌によって生物処理が行われる。この場合の二次曝気槽 21 は、15 硝化と BOD 除去との両方の機能を有する。そして、二次曝気槽 21 での処理液である硝化液の一部は、図示しないが、無酸素槽 6 へ返送され、硝化液中の硝酸或いは亜硝酸が脱窒されることとなる。

沈殿槽 4 は前記二次曝気槽 21 で生物処理された処理液を固液分離するためのものであり、分離された液分は処理液として再利用若しくは放流され、分離、沈殿した固形分である汚泥の一部は、次の可溶化槽 7 へ供給されるとともに、残りの一部は20 嫌気槽 18 へ返送される。

このような構成からなる処理装置によって、下水を処理する場合には、先ず、嫌気槽 18 へ下水が供給される。嫌気処理後の処理水は、次工程の一次曝気槽 19 に供給されて曝気攪拌されつつ好氣的に処理されることとなる。この曝気攪拌による好25 氣的な処理によって硝化処理がなされることとなる。

次に、一次曝気槽 19 で曝気処理された処理液は、無酸素槽 20 へ供給される。こ

の無酸素槽 20 では脱窒処理がなされる。無酸素槽 20 で脱窒処理された処理液は二次曝気槽 21 へ供給され、曝気攪拌されつつ好氣的に処理される。この二次曝気槽 21 での曝気処理によって硝化がなされ、BOD 除去がなされる。

次に、二次曝気槽 21 で曝気処理された処理液は、沈殿槽 4 へ供給される。この沈殿槽 4 では固液分離がされ、分離された液分は処理液として再利用若しくは放流され、また分離、沈殿した固形分である汚泥の一部は、可溶化槽 7 へ供給され、上記実施形態の菌株により好氣的に汚泥が可溶化される。また、沈殿した汚泥の残りの一部は、嫌気槽 18 へ返送汚泥として返送される。

可溶化槽 7 で可溶化処理された汚泥は、前記無酸素槽 20 へ返送され、再度処理される。そして、無酸素槽 20 での脱窒処理、二次曝気槽 21 での曝気処理、沈殿槽 4 での固液分離、可溶化槽 7 で可溶化処理が循環して繰り返されることとなる。

可溶化槽 7 のHRTは、菌の生成および分泌量が最大となるHRTに基づいて選択することが好ましい。このようにHRTを設定すれば、生成及び分泌された汚泥可溶化酵素による反応を効率的に利用できる。通常、HRTは12～72時間に設定するのが好ましく、可溶化液中のアンモニアを酸化する観点からは24～72時間に設定するのがより好ましく、可溶化装置のコンパクト化及び処理水質の向上の両方を維持する観点からは、36～48時間に設定するのが最も好ましい。

また、可溶化槽 7 以外の槽のHRTは、嫌気槽 4 で0.5～1.5時間、一次曝気槽 5 で2～6時間、無酸素槽 6 で0.5～3時間、二次曝気槽 7 で0.5～2時間、好ましくは嫌気槽 4 で0.5～1時間、一次曝気槽 5 で3～5時間、無酸素槽 6 で1～2時間、二次曝気槽 7 で0.5～1.5時間が好ましい。

可溶化槽 7 の温度は、上記実施例 1 と同様に 45～70℃の温度範囲、好ましくは50～65℃の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pHも上記実施例 2 と同様に pH5.5～9 の範囲、好ましくは6～8.5 の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例 2 と同様である。さらに菌株を可溶化槽 7 に予め保持させ、又は可溶化槽 7 に供給される汚

泥に予め含有させ、或いは可溶化槽 7 に新たに添加しうることも実施例 2 と同様である。

(実施例 9)

本実施形態では、無酸素槽が 2 槽設けられているとともに、曝気槽は 1 槽のみ設けられ、この点で上記実施例 8 と相違している。

すなわち、本実施例の処理装置は、図 10 に示すように、前無酸素槽 23、嫌気槽 18、互換槽 24、無酸素槽 20、曝気槽 25、沈殿槽 4、濃縮機 9、及び可溶化槽 7 を具備している。

本実施形態では、嫌気槽 18 に流入された原水は互換槽 24 に供給される。

10 この互換槽 24 では、流入下水の脱窒程度によって曝気槽 25 からの汚泥及び処理液（硝化液）の返送の経路を変更する機能が奏される。たとえば夏期等の脱窒の程度が高い時期では、嫌気槽として活用することにより嫌気状態での返送汚泥のリン放出反応が促進され、冬期等の脱窒の程度が低い時期では、無酸素槽として活用することにより原水及び曝気槽 25 から前無酸素槽 23 或いは互換槽 24 に返送される硝
15 化液の脱窒反応が促進されることとなる。

このように互換槽 24 での処理が行われた後、原水は無酸素槽 20 に供給されて脱窒処理され、さらに曝気槽 25 に供給されて曝気攪拌により好氣的に生物処理される。次に曝気槽 25 から沈殿槽 4 に供給され、この沈殿槽 4 では固液分離がされ、分離された液分は適宜放流される。また分離、沈殿した固形分である汚泥は、濃縮機 9
20 へ供給され、可溶化槽 7 へ供給される。この場合、曝気槽 25 は、BOD の除去と硝化の機能を有するものである。曝気槽 25 の処理液である硝化液一部は、前無酸素槽 23、好ましくは(図示しないが)無酸素槽 20 へ返送される。

さらに、可溶化槽 7 で可溶化処理された汚泥は、互換槽 24 へ返送され、互換槽 24、無酸素槽 20、曝気槽 25、沈殿槽 4、濃縮機 9、可溶化槽 7 を循環することとな
25 る。尚、沈殿槽 4 で分離された汚泥は、濃縮機 9 へ供給される他、前無酸素槽 23 へも返送される。また前無酸素槽 23 へは、嫌気槽 18 や互換槽 24 からも汚泥が返送さ

れる。

可溶化槽 7 の温度は、上記実施例 1 と同様に 45 ～ 70℃ の温度範囲、好ましくは 50 ～ 65℃ の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pH も上記実施例 2 と同様に pH5.5 ～ 9 の範囲、好ましくは 6 ～ 8.5 の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4 種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例 2 と同様である。さらに菌株を可溶化槽 7 に予め保持させ、又は可溶化槽 7 に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽 7 に新たに添加しうることも実施例 2 と同様である。

(実施例 10)

- 10 本実施例の処理装置は、図 11 に示すように、嫌気槽 18、無酸素槽 20、曝気槽 25、沈殿槽 4、及び可溶化槽 7 を具備している。

本実施形態では、嫌気槽 18 で原水の嫌気処理がなされ汚泥中のリン成分が放出された後、無酸素槽 20 へ供給され、無酸素槽 20 で脱窒処理がなされる。無酸素槽 20 で脱窒処理された処理液は曝気槽 25 へ供給され、曝気槽 25 で汚泥に含まれるアンモニアが亜硝酸や硝酸まで変化する。すなわち、曝気槽 13 では硝化処理がなされているのである。

次に、曝気槽 25 で硝化処理された処理液は、沈殿槽 4 へ供給される。この沈殿槽 4 では固液分離がされ、分離された液分は放流等され、また分離、沈殿した固形分である汚泥の一部は、可溶化槽 7 へ供給されるとともに、残りは返送汚泥として嫌気槽 18 に返送される。

可溶化処理後の汚泥は、嫌気槽 18 へ返送され、無酸素槽 20 での脱窒処理、曝気槽 25 での処理、沈殿槽 4 での固液分離、可溶化槽 7 で可溶化処理が循環して繰り返されることとなる。また、曝気槽 25 で処理された硝化液の一部は、無酸素槽 20 又は嫌気槽 18 に返送され、無酸素槽 20 で脱窒処理される。

25 可溶化槽 7 の温度は、上記実施例 1 と同様に 45 ～ 70℃ の温度範囲、好ましくは 50 ～ 65℃ の温度範囲に設定するのが好ましい。また、pH も上記実施例 2 と

同様に pH5.5～9 の範囲、好ましくは 6～8.5 の範囲になるように設定するのが好ましい。また、4 種の菌株を単独若しくは混合して使用しうることも実施例 2 と同様である。さらに菌株を可溶化槽 7 に予め保持させ、又は可溶化槽 7 に供給される汚泥に予め含有させ、或いは可溶化槽 7 に新たに添加しうることも実施例 2 と同様で

5 ある。

請 求 の 範 囲

1. ジオバチルス (Geobacillus) 属に属し、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有することを特徴とする新規微生物。

- 5 2. ジオバチルス (Geobacillus) 属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、下記菌学的性質を有することを特徴とする新規微生物。

A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ~ 0.8 μm 、長さ 2.0 ~ 4.0 μm の桿菌
10 (2) 運動性の有無：有り
(3) 胞子の有無：有り

B. 培養的性質 (普通寒天 [Nutrient agar] 平板培養)

- (1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状
(2) 色：クリーム色
15 (3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

- (1) グラム染色性：+
(2) 硝酸塩の還元：-
(3) インドールの生成：-
20 (4) 硫化水素の生成：-
(5) クエン酸の利用：-
(6) ウレアーゼ：-
(7) オキシダーゼ：+
(8) カタラーゼ：+
25 (9) 酸素に対する態度：好気性
(10) O-Fテスト (グルコース)：-/-

(11) 糖類からの酸及びガスの生成

D-グルコース：酸（+）／ガス（-）

3. ジオバチルス（*Geobacillus*）属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、下記菌学的性質を有することを特徴とする新規微生物。

A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ：幅 0.7 ～0.8 μm 、長さ 2.0 ～4.0 μm の桿菌
- (2) 運動性の有無：有り
- (3) 胞子の有無：有り

10 B. 培養的性質（普通寒天〔Nutrient agar〕平板培養）

- (1) コロニーの形態：円形、全縁滑らか、低凸状
- (2) 色：クリーム色
- (3) 光沢：有り

C. 生理学的性質

- 15 (1) グラム染色性：+
- (2) 硝酸塩の還元：-
- (3) インドールの生成：-
- (4) 硫化水素の生成：-
- (5) クエン酸の利用：-
- 20 (6) ウレアーゼ：-
- (7) オキシダーゼ：+
- (8) カタラーゼ：+
- (9) 酸素に対する態度：好気性
- (10) O-Fテスト（グルコース）：-/-

25 (11) 糖類からの酸及びガスの生成

D-グルコース：酸（+）／ガス（-）

(12) 醗酵性試験

- (a) D-グルコース：＋
- (b) D-フラクトース：＋
- (c) D-マンノース：＋
- 5 (d) D-ソルビトール：－
- (e) イノシトール：－
- (f) マルトース：＋
- (g) トレハロース：＋

(13) その他の生理学的性質

- 10 (a) β -ガラクトシダーゼ活性：－
- (b) アルギニンジヒドロラーゼ活性：－
- (c) リジンデカルボキシラーゼ活性：－
- (d) トリプトファンデアミナーゼ活性：－
- (e) アセトイン産生：－
- 15 (f) ゼラチナーゼ活性：＋
- (g) オルニチンデカルボキシラーゼ活性：－

4. ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 4 (FERM BP-08452) である
請求項 1 記載の新規微生物。

5. ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 5 (FERM BP-08453) である
20 請求項 1 記載の新規微生物。

6. ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 6 (FERM BP-08454) である
請求項 1 記載の新規微生物。

7. ジオバチルス・エスピー (Geobacillus sp.) S P T 7 (FERM BP-08455) である
請求項 1 記載の新規微生物。

25 8. ジオバチルス (Geobacillus) 属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物
性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、16S rRNA

遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 1 に記載の配列であることを特徴とする新規微生物。

9. ジオバチルス (*Geobacillus*) 属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、16S rRNA

5 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 2 に記載の配列であることを特徴とする新規微生物。

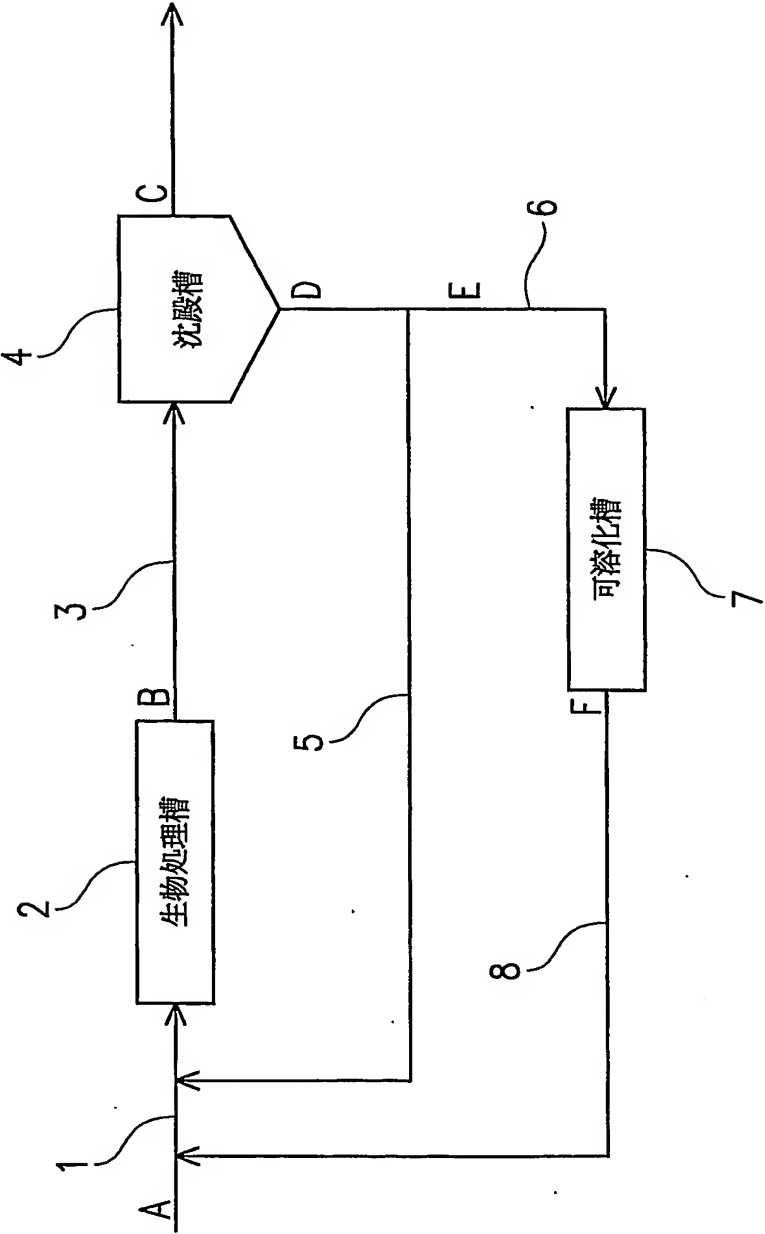
10. ジオバチルス (*Geobacillus*) 属に属する新規微生物であって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化する可溶化酵素の生産能を有し、16S rRNA

10 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 4 に記載の配列であることを特徴とする新規微生物。

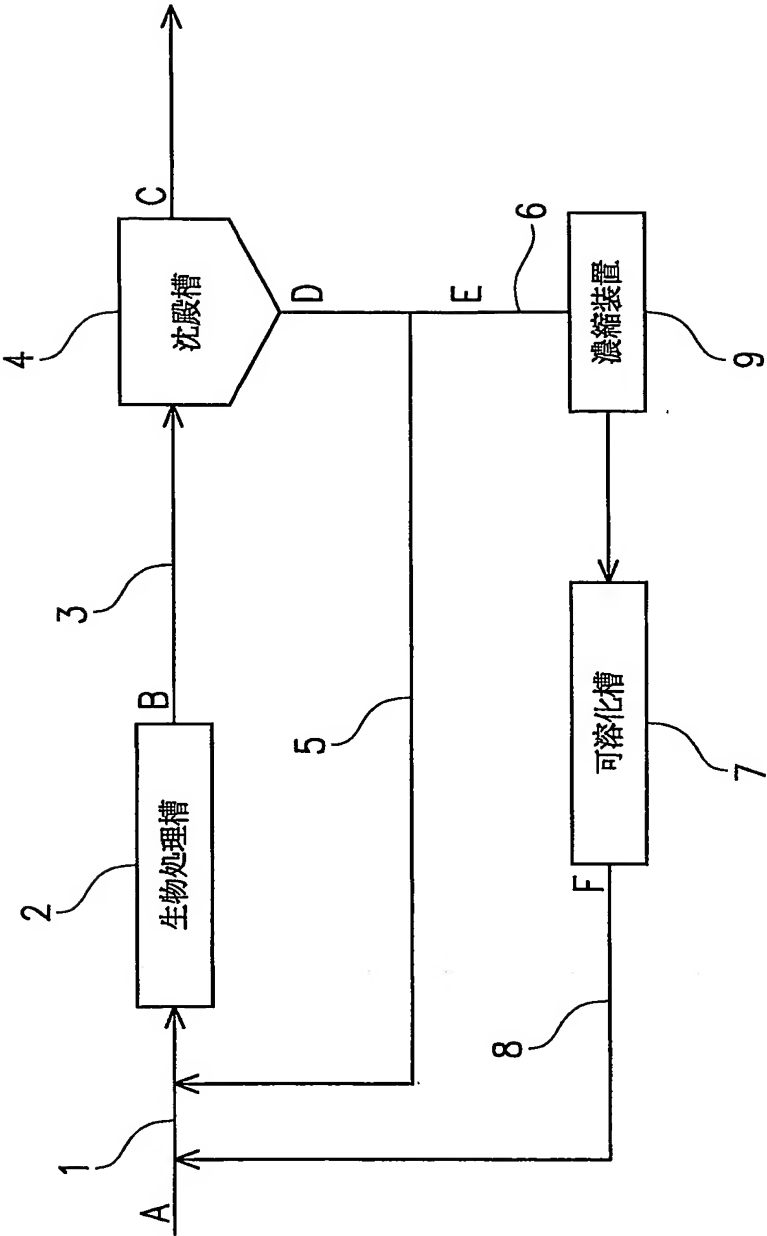
11. 請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載の新規微生物を少なくとも一種用いて有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化することを特徴とする有機性固形物の処理方法。

12. 請求項 4 記載の新規微生物、請求項 5 記載の新規微生物、又は請求項 6 記載
15 の新規微生物のいずれかと、請求項 7 記載の新規微生物とを混合した混合微生物によって、有機性汚泥、生物性汚泥等の有機性固形物を可溶化することを特徴とする有機性固形物の処理方法。

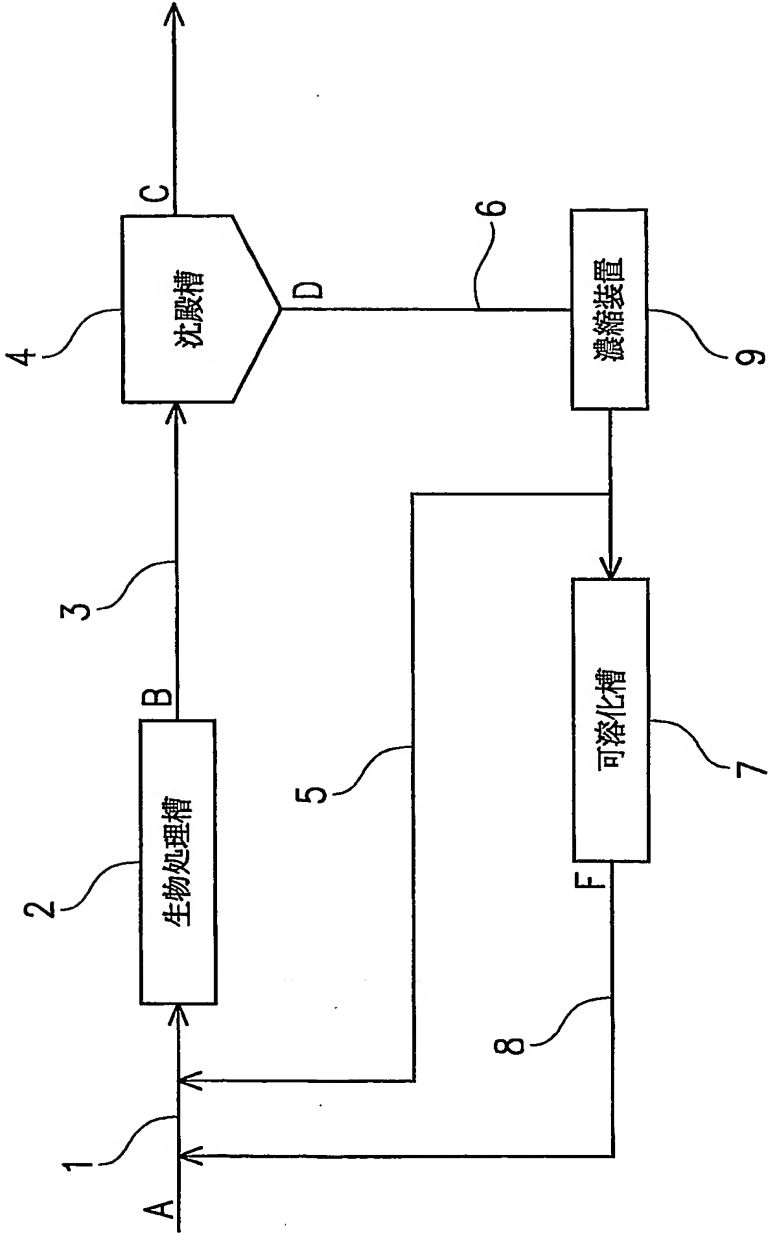
第 1 図



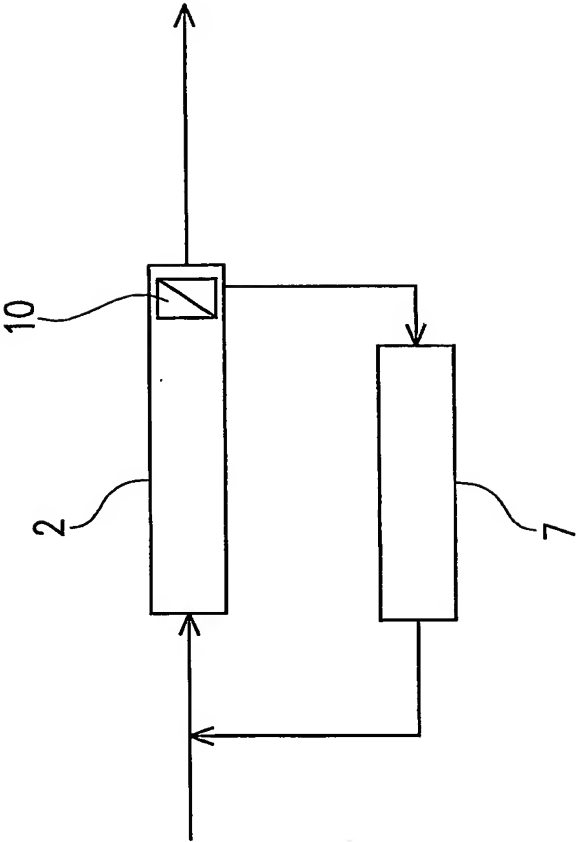
第 2 図



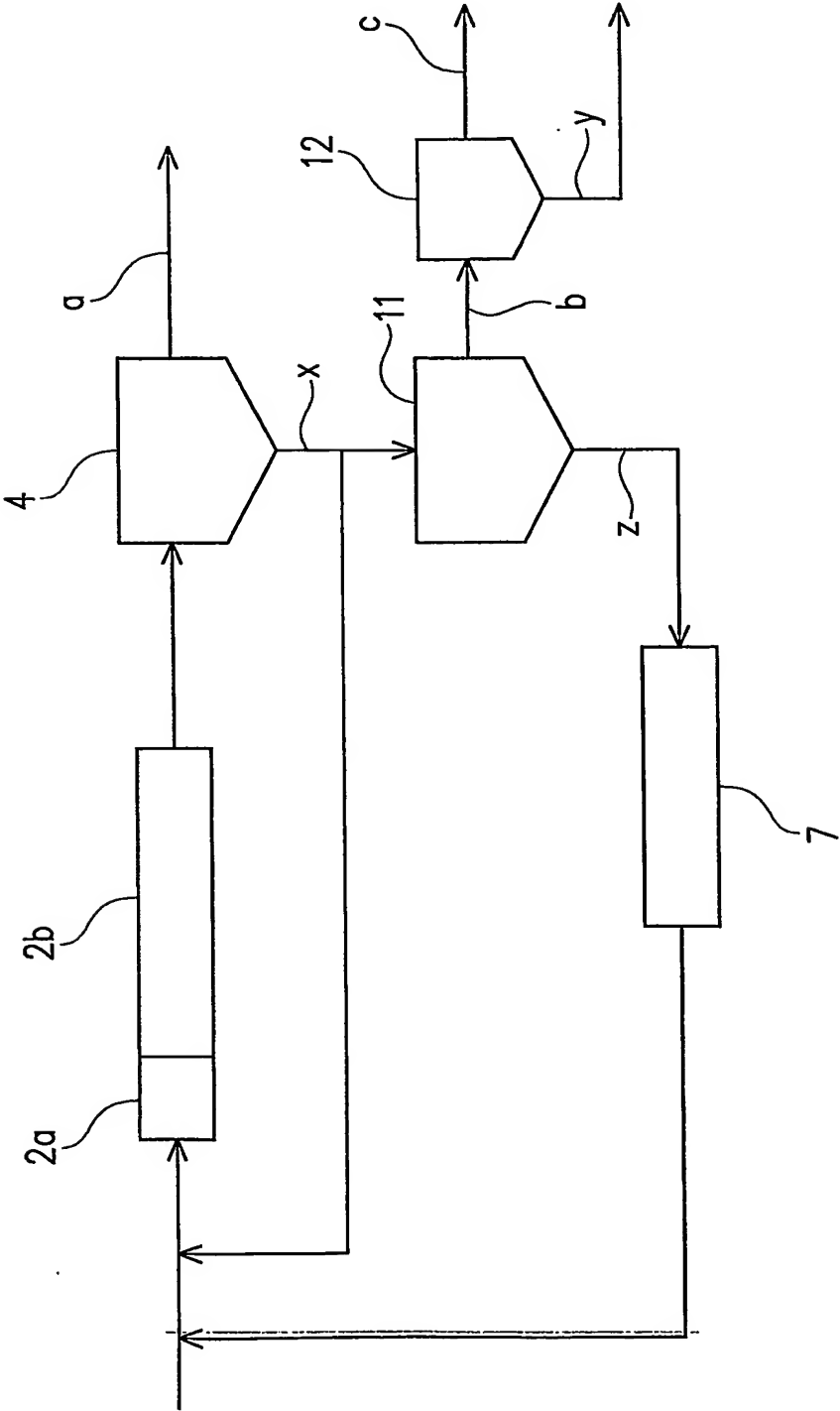
第 3 图



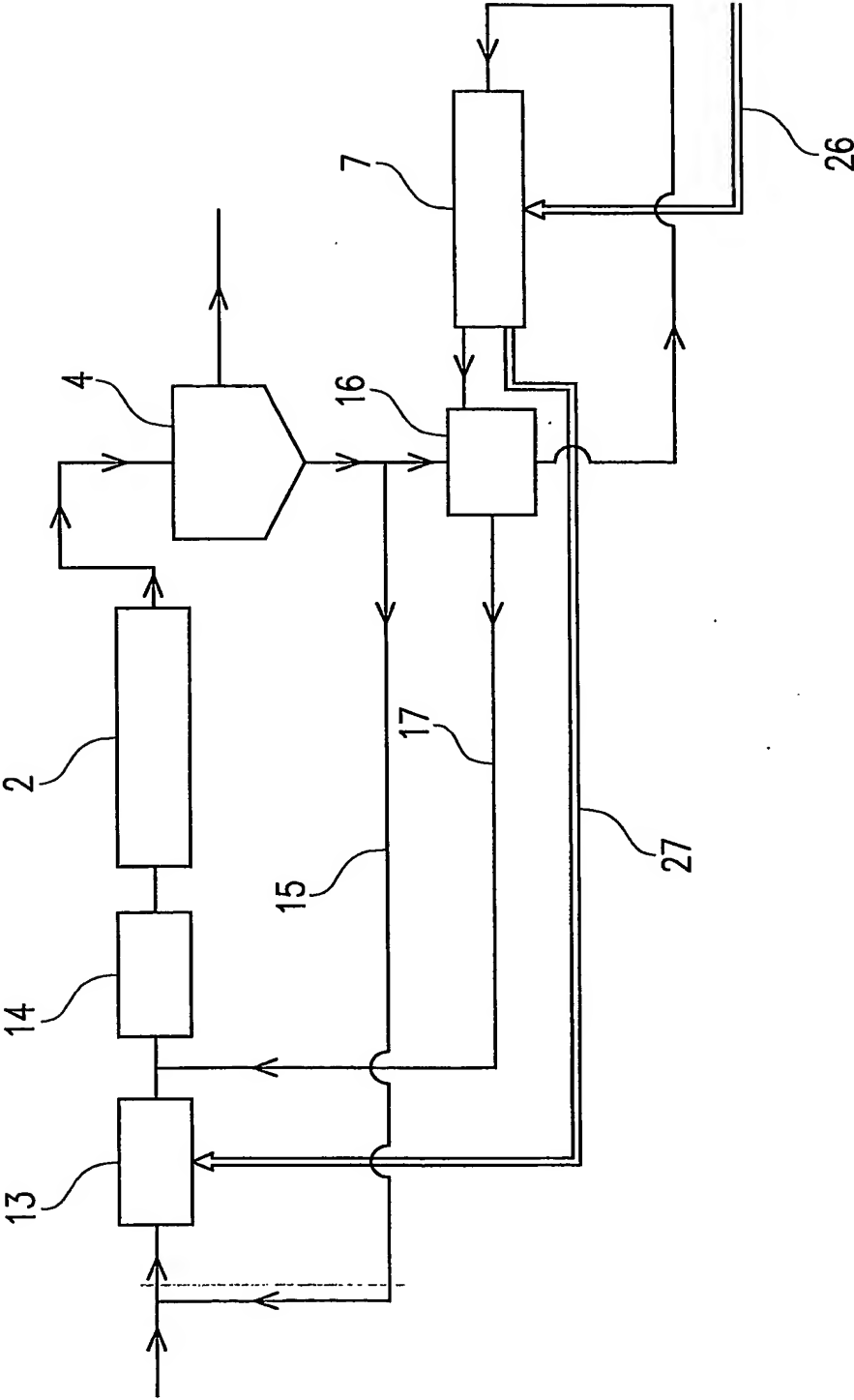
第 4 図



第 5 図



第 6 図



7/11

第 7 図

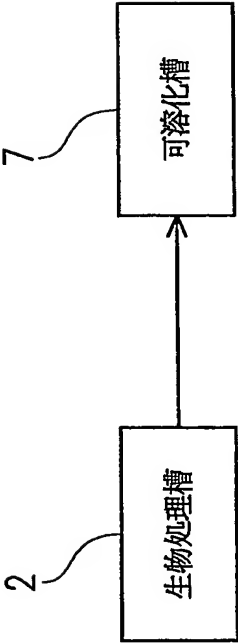
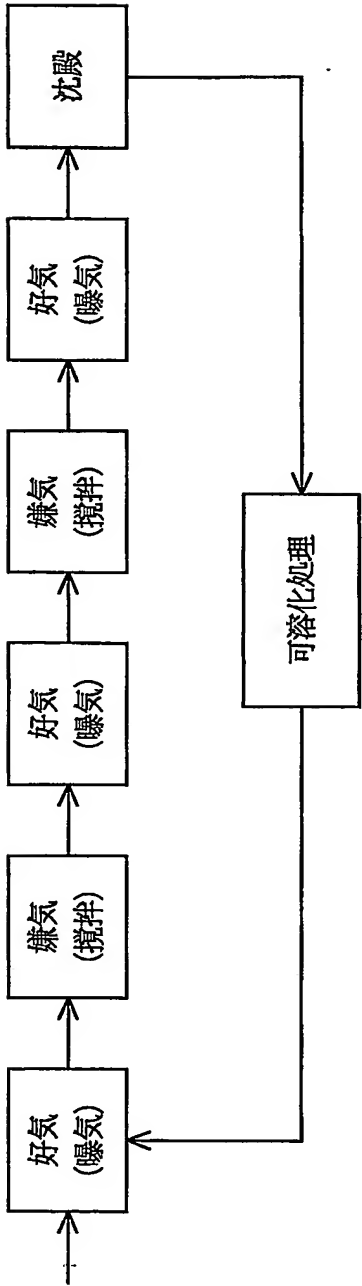
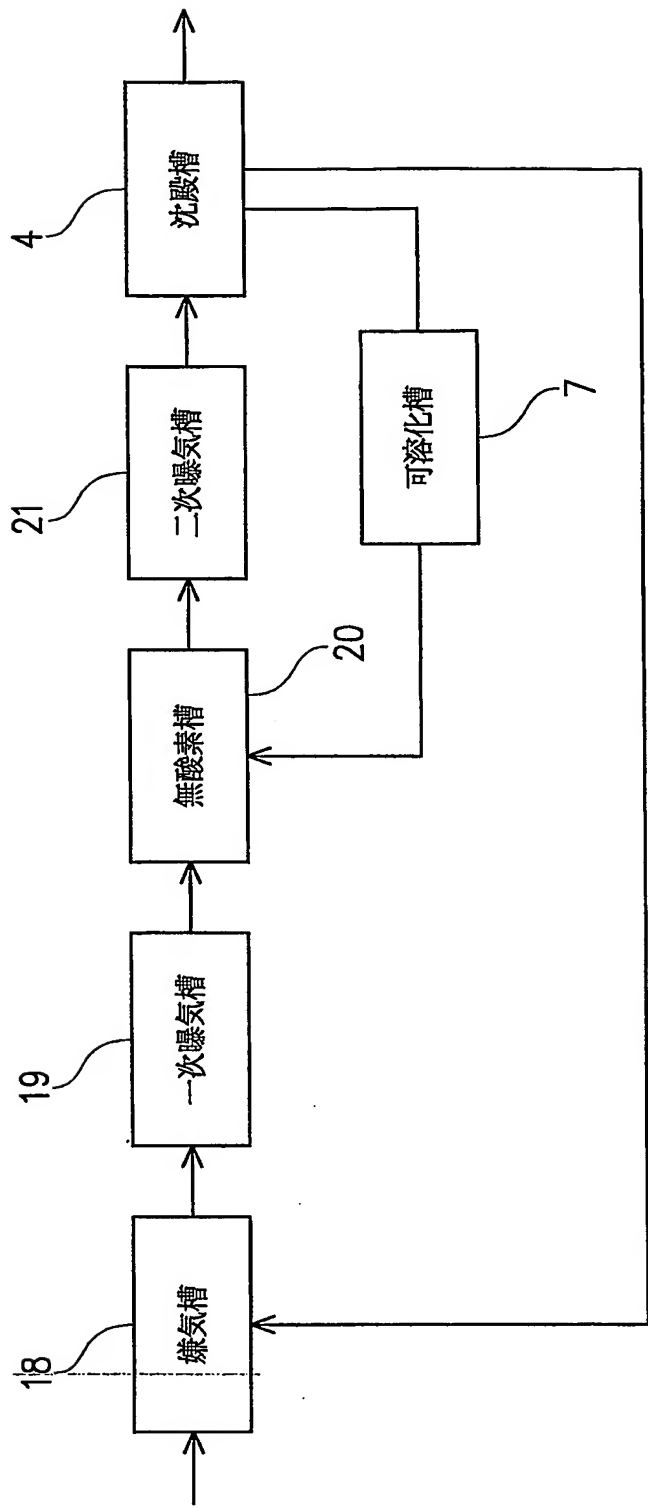


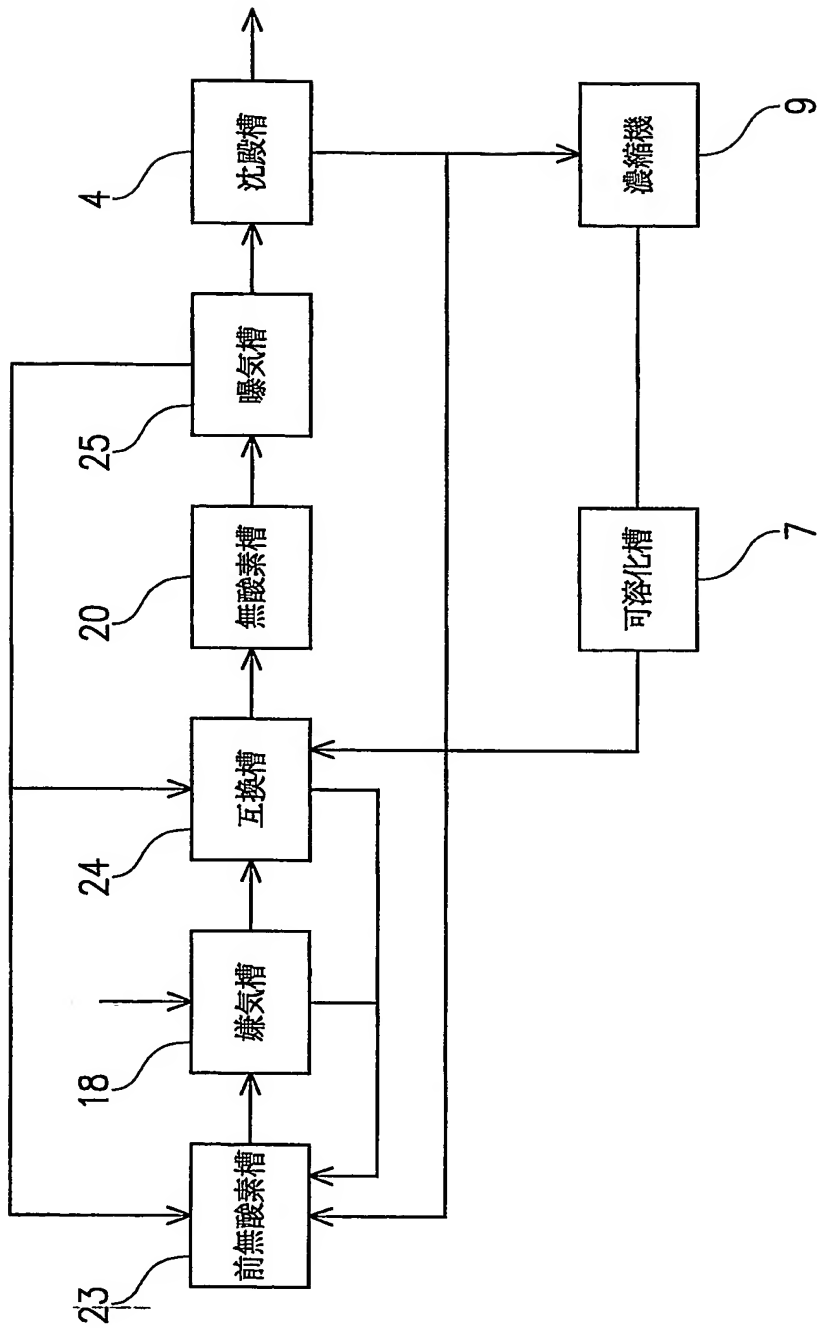
図 8



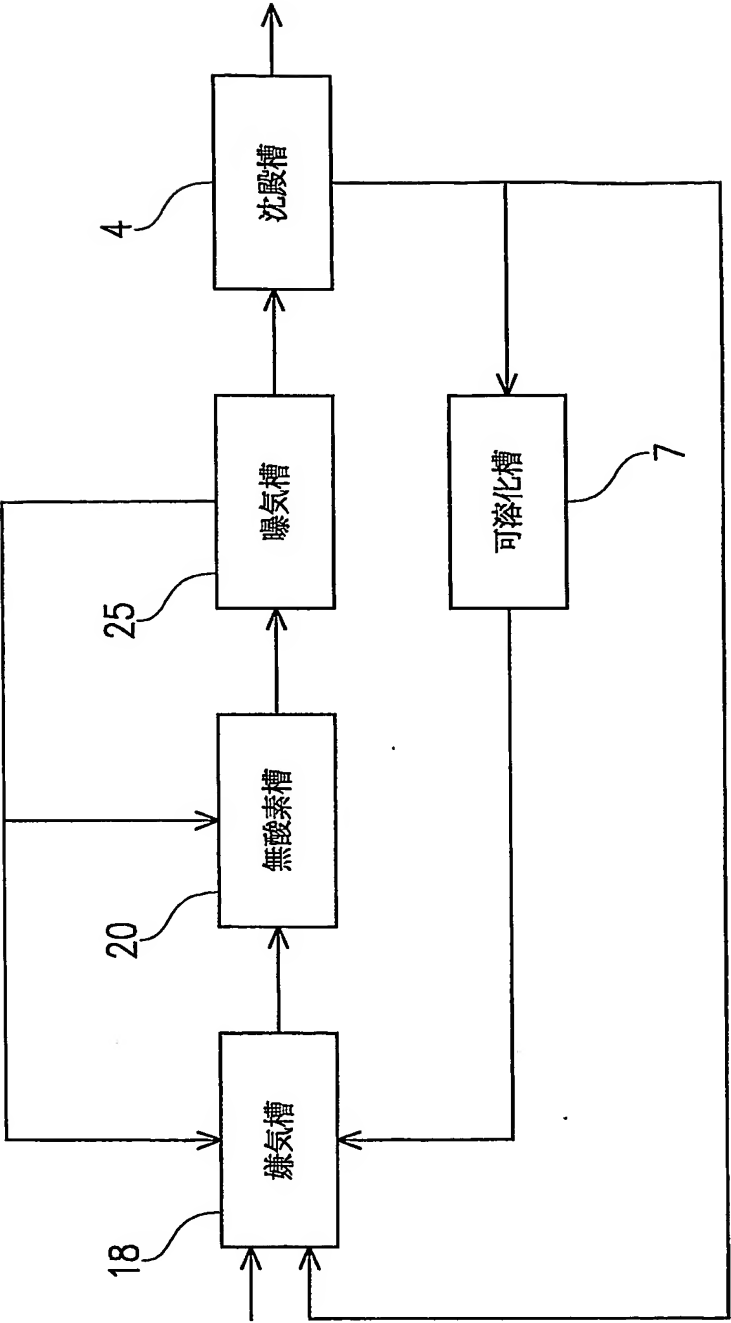
第 9 图



第 10 図



第 11 図



SEQUENCE LISTING

<110> SHINKO PANTEC CO., LTD

<120> 新規微生物及びその微生物を用いた有機性固形物の処理方法

<130> F-1910

<160> 6

<210> 1

<211> 1495

<212> DNA

<213> Geobacillus sp. SPT4

<400> 1

gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcggc ccggacagga gcttgctctt	60
gttcggttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggcaac ctaccgtaa gaccgggata	120
actccgggaa accggagcta ataccggata acaccgaaga ccgcatggc ttcggttgaa	180
aggcggcttt ggctgtcact tacggatggg cccgcggcgc attagctagt tggtaggta	240
acggctcacc aaggcgacga tgcgtagccg gcctgagagg gtgaccggcc aacttgggac	300
tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa	360
agtctgacgg agcgacgccg cgtgagcgaa gaaggtcttc ggatcgtaa gctctgttgt	420
tagggaagaa gaagtaccgt tcgaataggg cggtacggcg acggtaccta acgagaaagc	480
cccggttaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg ggcgagcgtt gtccggaatt	540
attgggcgta aagcgcgcg aggcgggtccc ttaagtctga tgtgaaagcc cacggctcaa	600
ccgtggaggg tcattggaaa ctgggggact tgagtgcaga agaggagagc ggaattccac	660
gtgtagcggg gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctctctgg	720
tctgtaactg acgctgaggc gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta	780
gtccacgccg taaacgatga gtgctaagtg ttagaggggt caaaccttt agtgctgcag	840
ctaacgcgtt aagcactccg cctggggagt acggccgcaa ggctgaaact caaaggaatt	900
gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct	960
taccaggtct tgacatcccc tgacaaccct agagataggg cgttccccct tcggggggac	1020
agggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggtaagtcc	1080
cgcaacgagc gcaacctctg accttagttg ccagcattca gttgggcact ctaaggtgac	1140
tgccgatgac aaatcggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcacatgcc cttatgacc	1200
tgggctacac acgtgctaca atgggcggtg caaagggtcg cgaacccgcg agggggagcg	1260
aatcccaaaa agccgctctc agttcggatt gcaggctgca actcgctgc atgaagccgg	1320
aatcgctagt aatcgcggtat cagcatgccg cggatgaatac gttccgggc cttgtacaca	1380

2 / 5

ccgcccgtca caccacgaga gcttgcaaca cccgaagtcg gtgaggtaac cctttcggga 1440
gccagccgcc gaaggtgggg caagtgattg ggggtgaagtc gtaacagggt agcca 1495

<210> 2

<211> 1498

<212> DNA

<213> *Geobacillus* sp. SPT5

<400> 2

agaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcgg actgaatggg agcttgctct 60
tgttcgggtca gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggcaa cctgcccgcga agaccgggat 120
aactccggga aaccggagct aataccggat aacaccgaag accgcatggt ctttggttga 180
aaggcggcgc aagctgccac ttgcgatgg gcccgcggcg cattagctag ttggtgaggt 240
aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc ggctgagag ggtgaccggc cacactggga 300
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatgggcga 360
aagcctgacg gagcgacgcc gcgtgagcga agaaggcctt cgggtcgtaa agctctgttg 420
tgagggacga aggagcgccg tttgaagaag gcggcgcggt gacggtacct cacgaggaag 480
ccccggctaa ctacgtgccg gcagccgcgg taatacgtag gggcgagcgt tgtccggaat 540
tattgggcgt aaagcgcgcg caggcggttc cttaagtctg atgtgaaagc ccacggctca 600
accgtggagg gtcattggaa actgggggac ttgagtgcag gagaggagag cggaattcca 660
cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg 720
gcctgcaact gacgctgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt 780
agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttagagggg tcacaccctt tagtgctgca 840
gtaacgcga taagcactcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat 900
tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
ttaccaggtc ttgacatccc ctgacaacc aagagattgg gcgttcccc ttcgggggga 1020
cagggtgaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct gtgagatgtt gggttaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt cgcctctagt tgccagcatt cggttgggca ctctagaggg 1140
actgccggcg acaagtcgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga 1200
cctgggctac acacgtgcta caatgggcgg tacaaagggc tgcgaaccgg cgagggggag 1260
-----cgaatcccaa aaagccgctc tcagttcgga ttgcaggctg caactcgcct gcatgaagcc----- 1320
ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc cgcggtgaat acgttccgg gccttgta 1380
caccgcccgt cacaccacga gagcttgcaa caccgaagt cggtaggca accggttctg 1440
ggagccagcc gccgaaggtg gggcaagtga ttggggtgaa gtcgtaacag ggtagcca 1498

3 / 5

<210> 3

<211> 1495

<212> DNA

<213> *Geobacillus* sp. SPT6

<400> 3

gaacgctggc	ggcgtgccta	atacatgcaa	gtcgagcggg	cggacagga	gcttgctctt	60
gttcggtag	cggcggacgg	gtgagtaaca	cgtgggcaac	ctacccgtaa	gaccgggata	120
actccgggaa	accggagcta	ataccggata	acaccgaaga	cgcgatggtc	ttcgggtgaa	180
aggcggcttt	ggctgtcact	tacggatggg	cccgcggcgc	attagctagt	tggtgaggta	240
acggctcacc	aaggcgacga	tgcgtagccg	gcctgagagg	gtgaccggcc	acactgggac	300
tgagacacgg	cccagactcc	tacgggaggg	agcagtaggg	aatcttcgc	aatggacgaa	360
agtctgacgg	agcgacgccg	cgtgagcgaa	gaaggctctt	ggatcgtaaa	gctctgttgt	420
tagggaagaa	gaagtaccgt	tcgaataggg	cggtagcgtg	acggtacct	acgagaaagc	480
cccggctaac	tacgtgccag	cagccgcggt	aatacgtagg	ggcgagcgtt	gtccggaatt	540
attgggcgta	aagcgcgcgc	aggcgggtccc	ttaagtctga	tgtgaaagcc	cacggctcaa	600
ccgtggaggg	tcattggaaa	ctgggggact	tgagtgcaga	agaggagagc	ggaattccac	660
gtgtagcggg	gaaatgcgta	gagatgtgga	ggaacaccag	tggcgaaggg	ggctctctgg	720
tctgtaactg	acgctgaggg	gcgaaagcgt	ggggagcaaa	caggattaga	taccctggta	780
gtccacgccg	taaacgatga	gtgctaagt	ttagaggggt	caaacccttt	agtgtctgcg	840
ctaacgcgtt	aagcactccg	cctggggagt	acggccgcaa	ggctgaaact	caaaggaatt	900
gacggggggc	cgcacaagcg	gtggagcatg	tggtttaatt	cgaagcaacg	cgaagaacct	960
taccaggtct	tgacatcccc	tgacaaccct	agagataggg	cgttccccct	tcggggggac	1020
agggtgacag	gtggtgcatg	gttgtcgtca	gctcgtgtcg	tgagatgttg	ggttaagtcc	1080
cgcaacgagc	gcaaccctcg	accttagttg	ccagcattca	gttgggcaat	ctaaggtgac	1140
tgccgatgac	aaatcggagg	aaggtgggga	tgacgtcaaa	tcacatgcc	ccttatgacc	1200
tgggctacac	acgtgctaca	atgggcggta	caaaggcgtg	cgaaccgcgc	agggggagcg	1260
aatcccaaaa	agccgctctc	agttcggatt	gcaggctgca	actgcctgca	atgaagccgg	1320
aatcgctagt	aatcgcggat	cagcatgccg	cggatgaatac	gttcccgggc	cttgtagaca	1380
ccgcccgtca	caccacgaga	gcttgcaaca	cccgaagtcg	gtgaggtaac	cctttcggga	1440
gccagcggcc	gaaggtgggg	caagtgattg	gggtgaagtc	gtaacagggt	agcca	1495

<210> 4

<211> 1498

4 / 5

<212> DNA

<213> *Geobacillus* sp. SPT7

<400> 4

gagaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg gaccaaatcg gagcttgctc	60
tgatttggtc agcggcggac gggtagtaa cacgtgggca acctgcccgc aagaccggga	120
taactccggg aaaccggagc taataccgga taacaccgaa gaccgcatgg tctttggttg	180
aaaggcggcc tttggctgtc acttgcggtg gggcccgcgg cgcattagct agttggtagag	240
gtaacggctc accaaggcga cgatgcgtag cggcctgag agggtagaccg gccacactgg	300
gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaaatctc cgcaatgggc	360
gaaagcctga cggagcgacg ccgcgtgagc gaagaaggcc ttcgggtcgt aaagctctgt	420
tgtgagggac gaaggagcgc cgttcgaaga gggcggcgcg gtgacggtac ctcacgagga	480
agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggcgagc gttgtccgga	540
attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggc tccttaagtc tgatgtgaaa gccacaggct	600
caaccgtgga gggtcattgg aaactggggg acttgagtgc aggagaggag agcggaaattc	660
cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcggtcttc	720
tggcctgcaa ctgacgtga ggcgcgaaag cntggggagc aaacaggatt agataccctg	780
gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgtagagg ggtcacaccc tttagtgtg	840
cagctaacgc gataagcact ccgcctgggg agtacggccg caaggctgaa actcaaagga	900
attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcaagaa	960
ccttaccagg tcttgacatc ccctgacaac ccaagagatt gggcggtccc ccttcggggg	1020
gacagggtga caggtagtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag	1080
tcccgcacg agcgcacccc tcgcctctag ttgccagcac gaangtgggc actctagagg	1140
gactgccggc gacaagtcgg aggaaggtag ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg	1200
acctgggcta cacacgtgct acaatgggcg gtacaaaggc ctgcgaaccc gcgaggggga	1260
gcgaatccca aaaagccgct ctcagttcgg attgcaggct gcaactcgcc tgcataagc	1320
cggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag	1380
acaccgcccg tcacaccacg agagcttgca acaccgaag tcggtgnggt aacccttacg	1440
ggagccagcc gccgaaggtag gggcaagtga ttggggtgaa gtcgtaacag ggtagcca	1498

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 / 5

<400> 5

agagtttgat cctgcctcag

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggctaccttg ttacgactt

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/00, C02F11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/00, C02F11/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-62559 A (NKK Corp.), 04 March, 2003 (04.03.03), (Family: none)	1-12
A	JP 2002-125657 A (Mitsui Engineering & Shipbuilding Co., Ltd.), 08 May, 2002 (08.05.02), (Family: none)	1-12
A	JP 2000-167596 A (Konan Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 20 June, 2000 (20.06.00), (Family: none)	1-12
A	JP 2000-139449 A (Toray Industries, Inc.), 23 May, 2000 (23.05.00), (Family: none)	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 25 September, 2003 (25.09.03)

Date of mailing of the international search report
 14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

PCT/JP03/11008

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-234060 A (Shinko Pantec Co., Ltd), 09 September, 1997 (09.09.97), (Family: none)	1-12
A	XU, Dong et al., Phylogenetic relationships between <i>Bacillus</i> species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences., <i>Int.J.</i> <i>Syst.Evol.Microbiol.</i> , 2003 May, Vol.53(Pt3), pages 695 to 704	1-12
A	OBOJSKA, A. et al., Organophosphonate utilization by the thermophile <i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> T20. <i>Appl.Environ.Microbiol.</i> , 2002 April, Vol.68(4), pages 2081 to 2084	1-12
A	MAUGERI, T.L. et.al., Three novel halotolerant and thermophilic <i>Geobacillus</i> strains from shallow marine vents., <i>Syst.Appl.Microbiol.</i> , 2002 October, Vol.25(3), pages 450 to 455	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/00, C02F 11/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/00, C02F 11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-62559 A(日本鋼管株式会社)2003.03.04 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2002-125657 A(三井造船株式会社)2002.05.08 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2000-167596 A(興南化学工業株式会社)2000.06.20 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2000-139449 A(東レ株式会社)2000.05.23 (ファミリーなし)	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.09.03

国際調査報告の発送日

14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



4N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-234060 A(神鋼パンテック株式会社)1997. 09. 09 (ファミリーなし)	1-12
A	XU, Dong et al., Phylogenetic relationships between <i>Bacillus</i> species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> 2003 May, vol. 53 (Pt 3), pp. 695-704	1-12
A	OBOJSKA, A. et al., Organophosphonate utilization by the thermophile <i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> T20. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2002 Apr, vol. 68 (4), pp. 2081-2084	1-12
A	MAUGERI, T. L. et al., Three novel halotolerant and thermophilic <i>Geobacillus</i> strains from shallow marine vents. <i>Syst Appl Microbiol.</i> 2002 Oct, vol. 25 (3), pp. 450-455	1-12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.